

**Estudio de parámetros instrumentales que
afectan a la separación en técnicas de
fraccionamiento en flujo mediante campo (FFF).
Aplicación a la caracterización de
nanopartículas de dióxido de titanio.**

Trabajo Fin de Grado

Pablo Sánchez Díez de Arizaleta



Universidad Zaragoza

Director: Eduardo Bolea Morales

Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza

Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAS)

Junio 2018

ÍNDICE DEL TRABAJO

Resumen

<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	<u>1</u>
1.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS FFF.	1
1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS FFF.	1
1.3 FRACCIONAMIENTO EN FLUJO MEDIANTE CAMPO DE FLUJO ASIMÉTRICO (AF4).	2
1.4 COMPARACIÓN CON OTRAS TÉCNICAS.	3
 <u>2. OBJETIVOS</u>	 <u>4</u>
 <u>3. EXPERIMENTAL</u>	 <u>5</u>
3.1 INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS	5
3.1.1. Instrumentación.....	5
3.1.2. Aparatos	5
3.1.3. Material	5
3.1.4. Reactivos	5
3.2 PROCEDIMIENTOS.....	6
3.2.1 Puesta en marcha del equipo AF4.....	6
3.2.2 Preparación y puesta en disolución de las muestras.....	6
3.3 ETAPAS DEL PROCESO DE ELUCIÓN DE LAS ESPECIES EN EL INTERIOR DEL CANAL.	8
3.4 SISTEMAS DE DETECCIÓN.	8
3.5 PARÁMETROS QUE NOS PERMITEN EVALUAR LA CALIDAD DE UNA SEPARACIÓN.	9
3.5.1 Tiempo muerto y tiempo de retención.	9
3.5.2 Recuperación.	9
3.5.3 Resolución.	9
3.6 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO.	10
 <u>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	 <u>10</u>
4.1 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES EN LA SEPARACIÓN DE ESTÁNDARES MONODISPERSOS DE NANO Y MICRO PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO.....	10
4.1.1 Estudio del efecto de la variación de la longitud del canal en la separación.´	10
.....	13

4.1.2 Estudio del efecto de la variación del crossflow en la separación.	13
4.1.3 Estudio del efecto de la variación del caudal a la salida en la separación.	15
4.1.4 Estudio de la influencia de la fase móvil utilizada en la separación.	17
4.2 SEPARACIÓN DE ESTÁNDARES POLIDISPERSOS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE TITANIO DE DIFERENTES TAMAÑOS.....	18
4.2.1 Separación con Crossflow de 0,1 mL/min.....	18
4.2.2 Separación con Crossflow de 0,2mL/min.	19
4.3 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE TITANIO EN PRODUCTOS DE CONSTRUCCIÓN CON PROPIEDADES FOTOCATALÍTICAS.	20
4.3.1 Caracterización del tamaño de las nanopartículas en el producto.	21
4.3.2 Estudio de las capacidades de resolución del procedimiento desarrollado en la separación tras la adición de nanopartículas de TiO ₂	21
4.3.3 Caracterización mediante AF4-ICP-MS.	23

5. CONCLUSIONES 24

6. BIBLIOGRAFÍA..... 25

7. ANEXOS 26

Resumen

La técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico, con sus siglas en inglés AF4 (Asymmetric flow field-flow fractionation), es una versátil técnica analítica que permite llevar a cabo la separación de nanopartículas en función de sus coeficientes de difusión, de manera que nos proporciona información sobre las distribuciones de tamaños de las especies presentes en una determinada muestra.

Cuando se acopla a detectores de manera on-line como pueden ser el plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas (ICP-MS) o el de absorbanza UV-VIS, AF4 proporciona información de varias propiedades de las nanopartículas, tales como su tamaño, composición, concentración o parámetros estructurales.

En este trabajo se ha desarrollado una metodología analítica que ha consistido en primer lugar en el estudio y optimización de las variables experimentales y las condiciones de separación de las nanopartículas en AF4, utilizando estándares de nanopartículas de poliestireno monodispersas de diferentes dimensiones, que han permitido modelizar su comportamiento de acuerdo a las expresiones teóricas descritas en bibliografía.

En segundo lugar, el estudio se ha centrado en aplicar las condiciones de separación previamente estudiadas, a la separación, identificación y caracterización de nanopartículas de dióxido de titanio previamente suspendidas en medios acuosos. Por último, se ha estudiado la presencia de estas nanopartículas en un producto de construcción con propiedades fotocatalíticas utilizando un ICP-MS como detector elemental.

Summary

The technique of asymmetric flow - field fractionation (AF4) is an analytical technique that has been growing in the last few decades and provide us a method for carry out the separation of nanoparticles according to their diffusion coefficients, therefore it will provide us information about the size distributions of the species that make up our sample.

When the AF4 is coupled to on-line detectors, such as inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP-MS) or a UV-VIS absorbance detector, this analytical technique can provide us information about a wide range of properties of the nanoparticles as their size, composition, concentration or structural parameters.

In this work an analytical methodology has been developed, which has consisted on the first place in the study and the optimization of the experimental variables and the separation condicions of the nanoparticles in AF4, using size-standards of monodisperse polystyrene nanoparticles of different dimensions, that have allowed to model their behaviour according to the theoretical equations founds in bibliography.

Secondly our study has focused on the application of the separation conditions which has been studied previously, to the separation, identification and characterization of titanium dioxide nanoparticles, previously suspended in aqueous media. Finally we have studied the presence of these nanoparticles in a building product with photocatalytic properties using a ICP-MS as an elemental detector.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS FFF.

El uso de la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo (FFF) para la separación y caracterización de nanopartículas ha crecido en las últimas décadas. Actualmente es un método muy habitual en la caracterización de nanopartículas tanto sintéticas como naturales ¹.

En ella aplicamos un campo o fuerza perpendicular e independiente de un caudal portador en el interior de un canal que circula en régimen laminar. La variación de este campo o fuerza perpendicular al flujo permite separar las especies en función de sus propiedades hidrodinámicas (fundamentalmente el coeficiente de difusión) y por tanto en función de su tamaño ². El coeficiente de difusión de un compuesto “i” (D_i) puede calcularse directamente de la ecuación de Stokes – Einstein, utilizando el diámetro hidrodinámico (D_h) de la especie en cuestión, como se muestra en la ecuación (1):

$$D_i = \frac{k T}{3\pi\mu D_h} \quad \text{Ecuación (1).}$$

donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, y μ es la viscosidad del portador ¹.

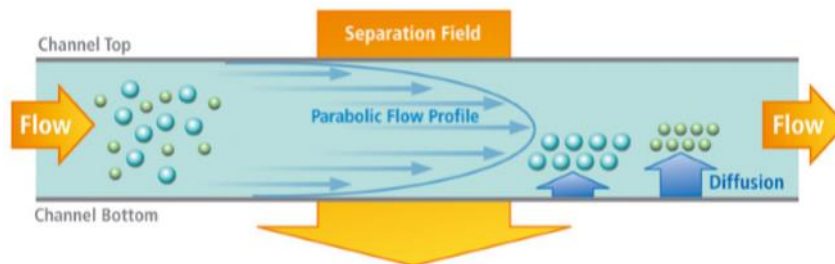


Figura 1. Esquema del fundamento del fraccionamiento en flujo mediante campo.

Como podemos ver representado (figura 1), cuanto más pequeñas sean las partículas (mayor coeficiente de difusión), mayor será su tendencia a alejarse de las paredes, lo que se traduce en que las partículas de menor tamaño se eluirán antes que las partículas de tamaños mayores, debido al perfil parabólico de velocidades definido por el régimen laminar en el interior del canal ³.

1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS FFF.

Podemos clasificar las diferentes técnicas de fraccionamiento en flujo en función del tipo de campo utilizado. Estos campos deben tener la suficiente fuerza como para conducir a las diferentes especies a las distintas posiciones del perfil parabólico del régimen laminar y deben tener una adecuada selectividad a la hora de separar las especies que se quieran estudiar.

De esta manera podemos emplear varios tipos de campos para que la técnica de fraccionamiento en flujo pueda cubrir un amplio rango de aplicaciones. Los campos que podemos utilizar son: ⁴

- Térmico (ThFFF): En el cual se utiliza un gradiente de temperatura y las especies se separan en función de sus coeficientes de difusión térmicos.

- Eléctrico (EFFF): La separación está basada en la diferencia de las cargas eléctricas de las partículas, las cuales se quiere llevar a cabo su separación.
- Sedimentación (SdFFF): La separación está controlada por diversos factores como el diámetro de la partícula, la diferencia entre la densidad del portador y la de la partícula, y la fuerza centrífuga aplicada.
- Flujo (FIFFF): Se basa en la utilización de un caudal, independiente y perpendicular al caudal portador, para llevar a cabo la separación de las partículas. Es universal y el más habitual en la separación de nanopartículas y micropartículas (Rango 1nm – 50µm).

A su vez, la técnica de FFF en flujo puede dividirse en dos tipos diferentes en función de la configuración del canal, distinguiendo entre flujo simétrico (sF4) o asimétrico (AF4).

En el primer caso, sF4, la forma del canal es simétrica, es decir, la parte superior e inferior del canal (las paredes) son permeables, de forma que el caudal perpendicular se aplica de manera uniforme a lo largo del canal y la anchura del canal se mantiene uniforme a lo largo del mismo (figura 2) ¹.



Figura 2. Perfil (spacer) utilizado en un canal simétrico.

Por otro lado, en el segundo caso, la forma del canal es asimétrica, de manera que la parte superior del canal es impermeable, de manera que el flujo a la entrada (Flow in) se divide en el flujo que recorre el canal (Flow out) y el flujo perpendicular aplicado (Cross flow). En este caso la anchura del canal va disminuyendo con el objeto de que el flujo perpendicular se mantenga uniforme (figura 3) ¹.

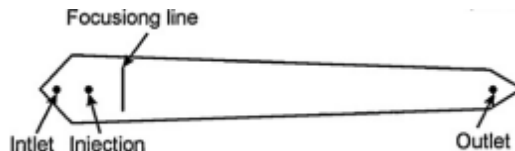


Figura 3. Perfil (spacer) utilizado en un canal asimétrico.

En ambos casos en el fondo del canal se sitúa una membrana de permeación que permite el paso del flujo cruzado, reteniendo al mismo tiempo las partículas que se desean separar en el interior del canal. El tamaño de poro de esta membrana establece el límite inferior de tamaño con el que se puede trabajar con esta técnica (habitualmente 10 kDa) ⁵.

Este tipo de técnica nos permite por tanto llevar a cabo la separación de especies en función del tamaño de sus partículas, desde 2-3 nm hasta varias micras aproximadamente y la obtención de distinta información en función del tipo de detector utilizado.

1.3 FRACCIONAMIENTO EN FLUJO MEDIANTE CAMPO DE FLUJO ASIMÉTRICO (AF4).

En AF4, el volumen de retención de una partícula puede relacionarse con su coeficiente de difusión y la velocidad de crossflow, V_c , como se puede observar en la ecuación 4 ¹.

$$D = \frac{\lambda V_c w^2}{V_o} \quad \text{Ecuación (4).}$$

Donde V_0 es el volumen “muerto” y λ es un parámetro de retención que puede calcularse a partir del volumen de retención medido utilizando la siguiente ecuación ¹:

$$R = \frac{t_0}{t_r} \quad \text{Ecuación (5).}$$

Donde R es el factor de retención. Asumiendo un nivel de retención elevado, se puede hacer la simplificación de $R = 6 \lambda$.

A partir de estas expresiones y haciendo alguna simplificación se llega a la ecuación 6, que relaciona el tiempo de retención (t_r) de las especies con variables experimentales a través de la teoría de FFF ⁹.

$$t_r = \frac{w^2}{6D_i} \ln\left(1 + \frac{V_c}{V_{out}}\right) \quad \text{Ecuación (6).}$$

Donde w es la espesor del spacer, D_i el coeficiente de difusión de la sustancia i , V_c el caudal del flujo cruzado (crossflow), y V_{out} el caudal de salida del canal.

A partir de esta expresión podemos deducir que:

- Atendiendo a la ley de Stokes (Ec. (1)), cuanto menor es el tamaño de una especie, mayor es su coeficiente de difusión, y por tanto menor es el tiempo de retención de la misma.
- Para una sustancia dada y con w fija, el tiempo de retención depende de la relación (V_c/V_{out}). Valores más altos de V_c llevan a mayores tiempos de retención, por lo que el crossflow se debe fijar para tener buenas separaciones en tiempos razonables.
- Los tiempos de retención de las especies no dependen de la longitud o anchura del propio canal. Eso sí, con un spacer delgado tendremos tiempos de retención más cortos que con un spacer grueso.

Para llevar a cabo una buena separación no solo los tiempos de retención de los analitos son importantes, la anchura de los picos obtenidos también se debería tener en cuenta para tener una separación óptima ya que afecta a la propia resolución. De la teoría se deriva una ecuación para el cálculo de la anchura de un pico de un compuesto retenido ⁹:

$$\sigma = 0,82 \frac{A_w}{V_c} \left[\ln\left(1 + \frac{V_c}{V_{out}}\right) \right]^{1/2} \quad \text{Ecuación (7).}$$

Donde A es el área del canal y los demás parámetros son los mismos que los del caso anterior.

Por tanto, de la ecuación (7) podemos deducir que para un canal de dimensiones más grandes, las anchuras de los picos obtenidas en el fractograma serán más grandes. Además podemos concluir que para una relación (V_c/V_{out}) dada, se deben aplicar valores más altos de crossflow para obtener picos lo más estrechos posible, sin embargo el valor de V_{out} está limitado por la presión en el interior del canal.

1.4 COMPARACIÓN CON OTRAS TÉCNICAS.

La AF4 tiene analogías con algunas técnicas cromatográficas, como pueden ser la cromatografía hidrodinámica (HDC) o la cromatografía de exclusión molecular (SEC). En ambos casos se inyecta un volumen discreto muestra en un flujo y se produce la separación de los componentes de la

muestra de forma secuencial pudiendo ser detectados o recogidos de forma individual. Sin embargo, en AF4 la separación de los componentes de la muestra se produce en el interior de un canal, en lugar de en una columna cromatográfica como en HDC o en SEC. Además se produce la separación en ausencia de fase estacionaria, mientras que en las técnicas cromatográficas es necesario hacer uso de la misma.

A priori, la principal ventaja de esta técnica de fraccionamiento en flujo respecto a las técnicas cromatográficas es que nos permite llevar a cabo una separación en función del tamaño de forma continua con una alta resolución y una mínima perturbación. Otra de las grandes ventajas de esta técnica de separación en continuo es que puede acoplarse a una amplia gama de detectores como pueden ser UV, ICP-MS, TEM, FLD, y OCD.

A pesar de que la técnica AF4 tiene bastantes ventajas en comparación con otros métodos y técnicas de separación, también tiene algunas limitaciones como pueden ser las interacciones partícula-membrana, la dilución de la muestra, el efecto de los componentes de la muestra sobre la separación o la sobrecarga del canal (overloading) en el caso de inyectar altas concentraciones, que puede afectar a los tiempos de retención de las especies separadas ^{1,2}.

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente Trabajo de Fin de Grado es conocer los fundamentos y las variables principales que afectan a la separación de la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo asimétrico (AF4) mediante la separación de nanopartículas de diferente naturaleza.

Este objetivo general lo podemos dividir en dos sub-objetivos específicos:

1. En primer lugar llevaremos a cabo el estudio de las variables experimentales que pueden influir en la calidad de la separación de nanopartículas en el interior del canal, utilizando un equipo AF4 conectado de manera on-line a un detector UV-VIS. Para ello se utilizarán dos canales con dimensiones diferentes y nanopartículas monodispersas de poliestireno como estándares para modelizar el comportamiento. Se estudiará si los resultados obtenidos siguen el comportamiento teóricamente esperado.
2. En segundo lugar, utilizaremos las condiciones experimentales del método estudiado aplicadas a la separación de nanopartículas de dióxido de titanio de distintos tamaños, procedentes de distintos tipos de muestras, tanto nanopartículas comerciales de TiO₂, como con un producto de construcción con propiedades fotocatalíticas. Por último se acoplará a un equipo ICP-MS como detector elemental, estudiándose las mejoras en las prestaciones del método analítico en términos de sensibilidad y selectividad en el estudio de este último producto.

3. EXPERIMENTAL

3.1 INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

3.1.1. Instrumentación

- Equipo de Fraccionamiento en Flujo mediante Campo de Flujo Asimétrico (AsF4). (Postnova Analytics, Landsberg, Germany).
Se han utilizado dos canales de dimensiones diferentes.
 - Canal de 14 cm (largo) x 2 cm (ancho).
 - Canal de 27,5 cm (largo) x 2 cm (ancho).En ambos canales se utilizó una membrana de celulosa regenerada con tamaño de poro de 5 kDa y un spacer (espaciador o perfil) con espesor de 350 μm ⁶.
- Espectrómetro Molecular UV-Vis Diode Array (Shimadzu, Duisburg, Germany).
- Espectrómetro ICP-MS Perkin Elmer SCIEX Elan DRC-e (Perkin Elmer, Toronto, Canada).
- Balanza Analítica GH-200 (AND, California, USA) con precisión $\pm 0,0001$ g.
- pH Metro Basic 20. (CRISON, Barcelona, Spain).
- Micropipeta 5-50 μL (Biohit, Helsinki, Finlandia). Error 0,5-0,8%.
- Micropipeta 200-1000 μL (Rainin, California, USA). Error 1,3%.
- Micropipeta 500-5000 μL (Rainin, California, USA). Error -0,6%.

3.1.2. Aparatos

- Baño ultrasonidos Ultrasons-P (Selecta, Barcelona, España)
- Sonda ultrasonidos Vibra-Cell (Sonics & Materials Inc., Danbury, U.S.A.)
- Equipo de filtración

3.1.3. Material

- Tubos tipo Falcon de polipropileno de 50 mL
- Filtros de membrana de nylon con tamaño de poro de 0,20 μm
- Jeringas de 2 mL
- Frascos para depósito de fase móvil y azida de sodio
- Espátula de micro cuchara de acero inoxidable

3.1.4. Reactivos

- Agua ultrapura (Milli-Q Advantage, Molsheim, Francia).
- Glicerol 1%
- Tampón pH 4,01 \pm 0,02
- Tampón pH 7,00 \pm 0,02
- Azida de sodio (NaN_3) 1g/L
- Disolución de HNO_3 al 1% (v/v) a partir de HNO_3 concentrado.
- NovaChem Surfactant (Postnova Analytics)
- Las suspensiones de nanopartículas de poliestireno se prepararon a partir de estándares comerciales de distintos tamaños y concentraciones: (Fluka):
 - Std poliestireno 100nm, 2%.
 - Std poliestireno 200nm, 2%
 - Std poliestireno 500nm, 2%

- Las suspensiones de nanopartículas de dióxido de titanio se prepararon a partir de estándares comerciales de distinto tamaño (Sigma Aldrich):
 - Std dióxido de titanio (rutilo) 30nm
 - Std dióxido de titanio (rutilo) 50nm
- Producto de construcción con propiedades fotocatalíticas para aplicar en fachadas y otros elementos externos a base de óxido de Ti (anatasa) (en matriz hidroalcohólica). (NANOTECNOLOGIA SPAIN S.L., Zaragoza, Spain).

3.2 PROCEDIMIENTOS.

3.2.1 Puesta en marcha del equipo AF4.

En primer lugar se prepara el portador. El portador que utilizaremos en el presente trabajo es principalmente Novachem, un tensoactivo mixto, al 0,05% (m/v). Lo prepararemos adicionando 500 μ L del reactivo puro a un litro de agua ultrapura. Posteriormente el portador se desgasifica con ayuda de un desgasificador en línea provisto con un filtro de membrana de nylon con tamaño de poro de 0,20 μ m. El portador suele tener un pH comprendido entre 8-9,5.

Posteriormente las bombas del sistema han de ser purgadas para evitar la presencia de zonas de aire en el interior del canal. Para el proceso de purga establecemos un sistema progresivo de caudales, en el cual, iniciamos con un tip flow y un focus flow de 1mL/min, y lo vamos aumentando progresivamente en 1mL/min aproximadamente en intervalos de 30 segundos, hasta 5mL/min, en este punto hacemos lo mismo pero en orden descendente hasta anular los caudales del tip flow y del focus flow.

Una vez que hemos purgado el sistema cerramos las bombas y aplicamos un tip flow de 1mL/min para controlar si las presiones del sistema son estables y están dentro de un rango aceptable (9-10 bar). Posteriormente se procede a la homogenización de todo el sistema con el portador, incluyendo la membrana de permeación mediante la aplicación durante 20 minutos de un programa, que consiste en aplicar simultáneamente los siguientes caudales:

- Tip Flow: 2 mL/min
- Focus Flow: 2 mL/min
- Cross Flow: 3 mL/min

En este punto el equipo se encuentra listo para ser utilizado y llevar a cabo las medidas experimentales.

3.2.2 Preparación y puesta en disolución de las muestras.

3.2.2.1 Suspensiones de poliestireno.

Prepararemos suspensiones de 30 mg/L de cada uno de los estándares comerciales de NPs de poliestireno. Para ello seguimos el siguiente procedimiento:

1º Sonicamos el bote del estándar comercial de poliestireno en el baño ultrasonidos durante 5 minutos.

2º En un tubo falcon de 50 mL, introducimos por pesada en balanza analítica las siguientes cantidades:

- 30 μ L del bote de poliestireno (2%) con ayuda de una micropipeta (pipeta 10 – 100 μ L).
- 20 mL de portador.

3.2.2.2 Suspensiones de dióxido de titanio.

A partir de los estándares prepararemos suspensiones de NPs de dióxido de titanio de concentración 15 mg/L. Para ello seguimos el siguiente procedimiento:

1º Por pesada en la balanza analítica tomamos en un tubo falcon 4 mg del estándar. (Nos ayudamos con una espátula con micro cuchara y con la mascarilla de protección respiratoria).

2º Rellenamos el tubo falcon hasta 25 mL con una disolución de glicerol 1%.

3º De esta manera habremos preparado una suspensión intermedia de NPs deTiO₂ de concentración 150 mg/L aproximadamente

4º Sonicamos la suspensión durante 15 minutos ayudándonos de la sonda ultrasónicos.

5º Diluimos 1:10 la suspensión intermedia para preparar la suspensión final de 15 mg/L.

3.2.2.3 Suspensiones del producto para construcción.

La concentración de óxido de Ti en el producto es de 37,17 mg/g. (determinación realizada tras ataque ácido del producto y medida mediante ICP-OES en los Servicios Centrales de Análisis de la Universidad de Zaragoza).

Prepararemos una suspensión de concentración 18,5 mg/L aproximadamente. Para ello cogeremos unos 20mL directamente del bote y los depositaremos en un tubo falcón. Pondremos esta disolución en la sonda ultrasónicos durante 10 minutos. Tras ello, tomaremos 20 μ L de la misma, por pesada en la balanza analítica, y los llevaremos hasta 40mL con portador. Como resultado de esta dilución obtendremos la disolución de concentración deseada. Esta será la suspensión que inyectemos en nuestro equipo para llevar a cabo las medidas experimentales.

3.2.2.4 Suspensión de pintura + Std TiO₂.

Por último vamos a preparar una suspensión de concentración 15 mg/L en el producto de construcción y 15 mg/L aproximadamente en TiO₂ de 30nm. Para prepararla tomaremos de la suspensión 150 mg/L de TiO₂, previamente preparada, 3,5mL, y tomaremos además de la suspensión 18,5 mg/L del material de construcción 35 mL. De esta manera diluiremos 1:10 la suspensión de TiO₂ de manera que pase a ser 15 mg/L y también diluiremos escasamente la suspensión del material de construcción de manera que la podemos considerar aproximadamente de concentración 15 mg/L.

*** Nota:** Es importante antes de llevar a cabo cada una de las medidas experimentales, sonicar la suspensión durante 5 minutos, para asegurarse que las partículas se encuentren en su forma libre, sin agregarse.

3.3 ETAPAS DEL PROCESO DE ELUCIÓN DE LAS ESPECIES EN EL INTERIOR DEL CANAL.

La utilización del equipo mediante la técnica AF4 se divide en las siguientes etapas, tal y como se recoge en la figura 4 ¹:

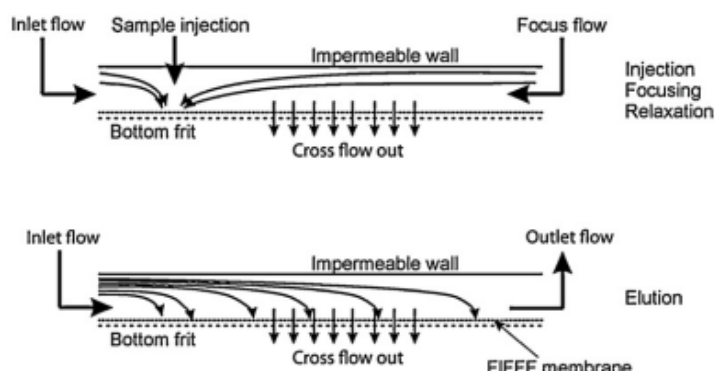


Figura 4. Etapas del proceso de elución de las especies en AF4.

- 1º Inyección: En la cual se introduce un volumen discreto de muestra en el interior del canal (en nuestro caso se introduce a través de una válvula de inyección de 6 vías, con un loop de almacenamiento de 100 μ L).
- 2º Relajación/Focalización: Se deja durante un tiempo que se alcance el equilibrio de las especies en el interior del canal, aplicando un flujo cruzado. (En nuestro trabajo experimental será de 4 minutos (en el que se produce la inyección y la focalización) más 1 minuto de tiempo de transición).
- 3º Elución: En el cual las especies introducidas en el canal previamente se eluyen en función de su tamaño, mientras se aplica un flujo cruzado.

3.4 SISTEMAS DE DETECCIÓN.

Como he comentado previamente, una de las grandes ventajas de la técnica AF4 es la posibilidad de acoplar el equipo a una amplia variedad de detectores, tanto on-line como off-line (figura 5)⁷.

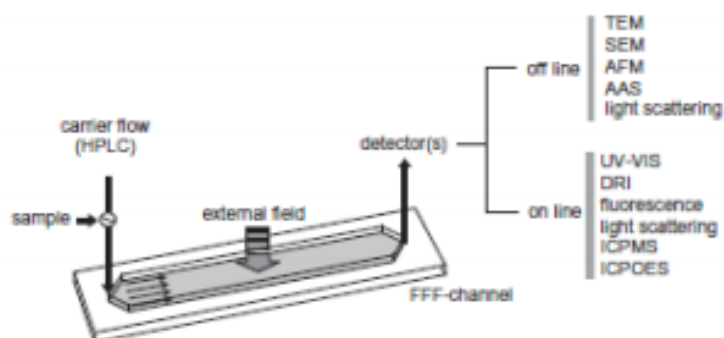


Figura 5. Esquema general de los distintos detectores on-line y off-line que se pueden acoplar a un equipo de FFF.

Esta flexibilidad nos permite conocer muchas de las propiedades de las partículas tales como su distribución de tamaños, su composición química, su estructura o las posibles especies asociadas a las partículas.

Durante nuestro trabajo experimental el equipo estará acoplado de manera on-line a un detector UV-VIS, asumiendo que la absorbancia ultravioleta-visible, registrada a una longitud de onda determinada, es proporcional a la concentración de partículas. Para NPs sintéticas como naturales, la

longitud de onda de absorción UV-Vis elegida debe coincidir con el máximo de absorción de dicha especie.

En la última parte del trabajo el equipo se acoplará tanto al detector UV-VIS como a un ICP-MS como detector elemental.

3.5 PARÁMETROS QUE NOS PERMITEN EVALUAR LA CALIDAD DE UNA SEPARACIÓN.

3.5.1 Tiempo muerto y tiempo de retención.

La señal que se obtiene en AF4 se denomina fractograma. Al principio del mismo siempre aparece un pico denominado “void peak” o pico de volumen/tiempo muerto. Este pico, previo a la etapa de elución, es debido a especies no focalizadas correctamente que se eluyen sin ser retenidas por acción del flujo aplicado. El tiempo al cual el void peak registra el máximo de absorbancia se denomina tiempo muerto, t_0 . Posteriormente en la etapa de elución nuestras especies se eluyen en interior del canal y el tiempo al cual se registra el máximo valor de absorbancia se denomina tiempo de retención, t_r , de manera análoga a cromatografía. (Figura 6).

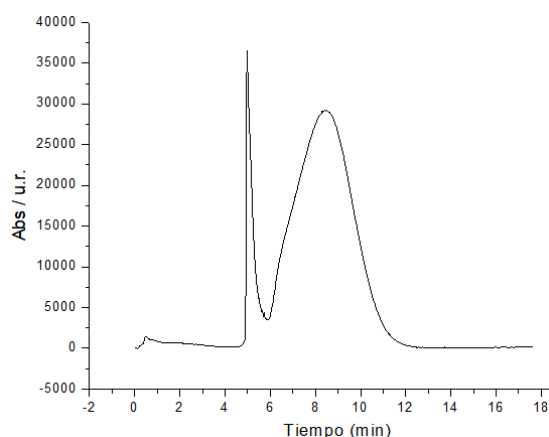


Figura 6. Fractograma de una muestra de NPs de poliestireno, en la cual se pueden diferenciar el void peak (primer pico), y el pico correspondiente a la elución de las NPs (segundo pico).

Tanto el tiempo muerto, t_0 , como el tiempo de retención, t_r , son parámetros muy importantes a la hora de evaluar la calidad de una separación de NPs en el interior del canal.

3.5.2 Recuperación.

Las recuperaciones definidas como la relación entre la masa recuperada después de cada análisis, m , y la masa total inyectada, m_0 , las calcularemos de acuerdo a la siguiente ecuación ⁸:

$$R(\%) = \frac{m}{m_0} \times 100 = \frac{\text{Área pico}}{\text{Área FIA}} \times 100 \quad \text{Ecuación (2).}$$

El valor de m_0 se obtiene llevando a cabo un análisis sin separación, realizando la inyección en ausencia de crossflow.

Por tanto, el valor de las recuperaciones ($R(\%)$) puede ser usado para dar una estimación de la capacidad del método para separar analitos sin una importante pérdida de material o información.

3.5.3 Resolución.

Por otro lado, para evaluar la calidad de la separación empleando unas condiciones experimentales dadas, utilizamos el factor de resolución, R_s , que determina el grado de separación entre dos analitos que se eluyen en el canal. Para AF4, la resolución viene definida por la siguiente expresión ⁸:

$$R_s = \frac{\Delta t_r}{\sigma} = \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{\text{Anchura media picos}} \quad \text{Ecuación (3).}$$

Donde σ es la media de las anchuras, definidas a mitad de la máxima altura, de los dos picos que se quiere calcular la resolución entre ellos.

En general se ha de buscar una separación de las NPs con una buena resolución y buenas recuperaciones en tiempos razonables.

3.6 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO.

La técnica AF4 proporciona buenas resoluciones en la separación de las nanopartículas (NPs). Sin embargo, la separación se puede ver comprometida por la influencia de distintos factores o procesos como pueden ser: La formación de agregados entre las NPs, interacciones entre las NPs y la membrana, repulsiones electrostáticas entre las propias NPs o la pre-elución de las especies debido a la sobrecarga del canal. Todos estos factores afectan a los tiempos de retención y a la recuperación.

Por todo ello, es necesario llevar a cabo una optimización de las variables y condiciones experimentales que influyen en la respuesta de nuestro método, para así, lograr una buena separación de las NPs y reducir la perturbación de la muestra ^{1,7}.

Las variables que vamos a optimizar en nuestro trabajo experimental son:

- Longitud del canal
- Composición de la fase móvil
- Caudal a la salida
- Crossflow

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES EN LA SEPARACIÓN DE ESTÁNDARES MONODISPERSOS DE NANO Y MICRO PARTÍCULAS DE POLIESTIRENO.

4.1.1 Estudio del efecto de la variación de la longitud del canal en la separación.

Teóricamente los tiempos de retención de las NPs no van a depender de la longitud o anchura del canal utilizado. En el laboratorio trabajaremos con dos canales distintos, uno largo y uno corto de menor área. De esta manera estudiaremos el efecto o influencia que pueda tener la variación de la longitud del canal en la calidad de separación de las NPs.

	Canal corto	Canal largo
Longitud	14 cm	27,5 cm
Anchura	2 cm	2 cm
Membrana (tam. poro)	5 KDa	5 KDa
Spacer (espesor)	350 μ m	350 μ m

Tabla 1. Comparación de las dimensiones convencionales de los dos canales utilizados.

Para llevar a cabo este estudio utilizaremos suspensiones de NPs de poliestireno de concentración 30 mg/L, preparadas a partir de estándares comerciales de distintos tamaños (100, 200 y 500nm) prácticamente monodispersas para que ese efecto sobre las anchuras de los picos obtenidos sea despreciable.

Realizaremos tres réplicas para cada suspensión de manera que podamos evaluar y establecer la repetitividad de nuestros resultados. Los expresaremos como la media de los valores obtenidos acompañada de la desviación estándar de los mismos.

Para el caso del canal largo los resultados experimentales fueron los siguientes:

NPs tamaño	t_0 (min)	t_r (min)	Área pico	Área FIA	Recuperación %
100nm	$4,98 \pm 0,005$	$8,45 \pm 3,68$	88716 ± 3575	125515 ± 2190	$70,7 \pm 2,8$
200nm	$4,97 \pm 0,009$	$10,63 \pm 0,02$	191422 ± 17641	259573 ± 692	$73,7 \pm 6,8$
500nm	$4,96 \pm 0,005$	$15,8 \pm 0,11$	146535 ± 7904	198730 ± 2689	$73,7 \pm 4,0$

Tabla 2. Resultados experimentales obtenidos en la separación de NPs de poliestireno con el canal largo. (1)

Las resoluciones obtenidas fueron las siguientes:

NPs tamaño	Anchura (min)	Comparación	Resolución
100nm	$3,10 \pm 0,02$	100nm - 200nm	0,63
200nm	$3,83 \pm 0,05$	200nm - 500nm	1,18
500nm	$5,03 \pm 0,02$	100nm - 500nm	1,82

Tabla 3. Resultados experimentales obtenidos en la separación de NPs de poliestireno con el canal largo. (2)

Por otro lado, para el canal corto, los resultados experimentales fueron los siguientes:

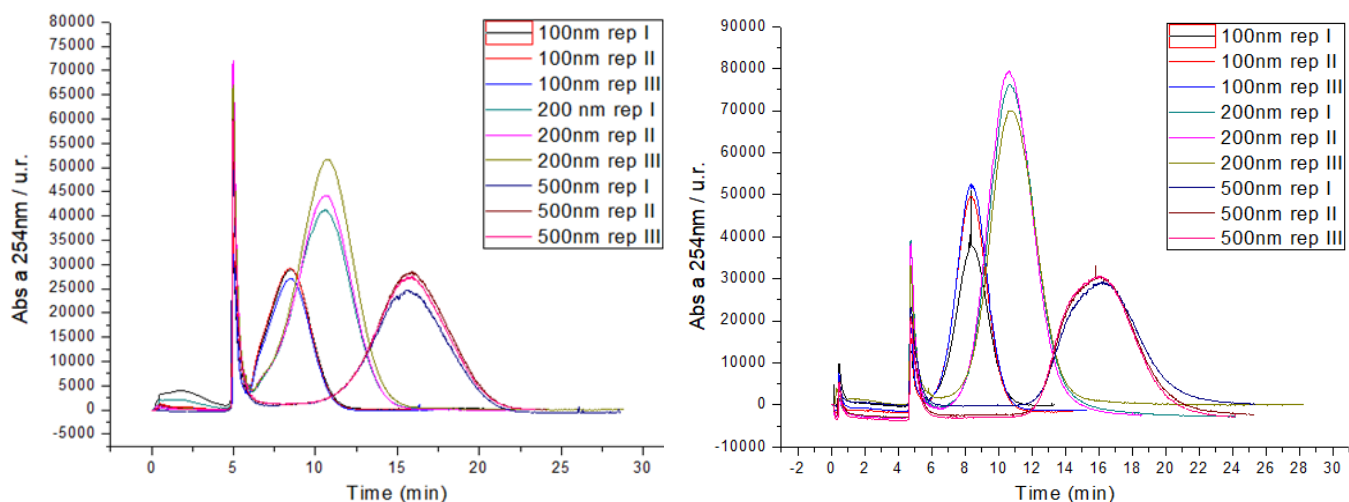
NPs tamaño	t_0 (min)	t_r (min)	Área pico	Área FIA	Recuperación %
100nm	$4,75 \pm 0,009$	$8,34 \pm 0,01$	112924 ± 14227	132133 ± 18	$85,5 \pm 10,8$
200nm	$4,74 \pm 0,005$	$10,69 \pm 0,07$	255568 ± 13684	300821 ± 1749	$85,0 \pm 0,3$
500nm	$4,75 \pm 0,005$	$16,04 \pm 0,19$	169232 ± 12092	197318 ± 1946	$85,8 \pm 6,1$

Tabla 4. Resultados experimentales obtenidos en la separación de NPs de poliestireno con el canal corto. (1)

Las resoluciones obtenidas fueron las siguientes:

NPs tamaño	Anchura (min)	Comparación	Resolución
100nm	$1,95 \pm 0,23$	100 - 200nm	0,94
200nm	$3,06 \pm 0,03$	200 - 500nm	1,33
500nm	$4,95 \pm 0,07$	100 - 500nm	2,23

Tabla 5. Resultados experimentales obtenidos en la separación de NPs de poliestireno con el canal corto. (2)

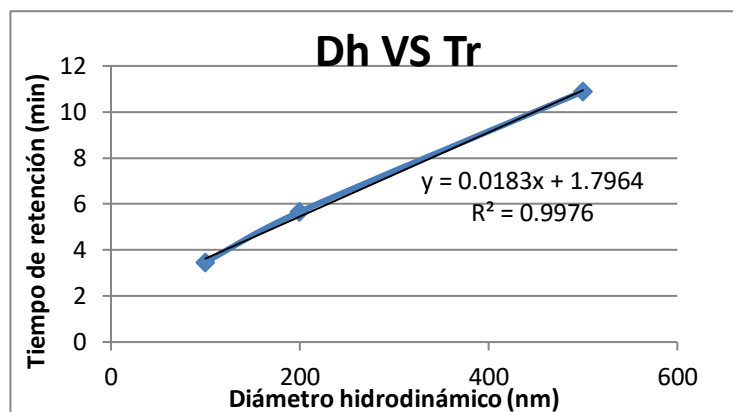
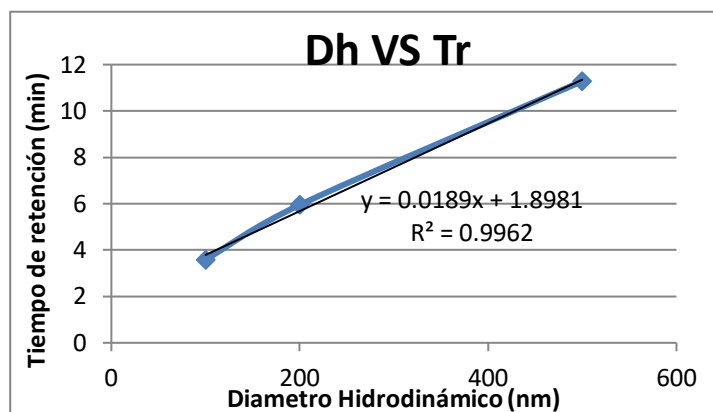


Figuras 7 y 8. Fractogramas correspondiente a los estándares de poliestireno de tamaño 100,200 y 500nm en el canal largo (izquierda) y en el canal corto (derecha).

Como resultados podemos observar que:

- Los tiempos de retención de las especies de tamaños semejantes son prácticamente los mismos, independientemente de que usemos el canal de longitud corta o el de longitud larga. Por tanto la longitud del canal no influye en los tiempos de elución de los analitos, tal y como se deduce de la ecuación (6).
- En cuanto a las recuperaciones, vemos que con el canal corto se obtienen recuperaciones superiores en un 10% con respecto al canal largo. Por tanto se podría decir que la longitud del canal sí que tiene una influencia en términos de recuperación, aunque no estaría justificado desde un punto de vista teórico. Es posible que los efectos del envejecimiento de la membrana (mayor en el caso del canal largo) causado por la inyección sucesiva de muestras, pueda afectar a la recuperación.
- Con respecto a la calidad de separación de las NPs de poliestireno comentar que, las anchuras obtenidas con el canal corto son menores que las obtenidas con el canal largo, al ser proporcional al área del mismo, de acuerdo a la ecuación (7). Este efecto es mayor para especies pequeñas, con menores tiempos de retención y menor efecto de la difusión. En definitiva, si atendemos a la expresión para el cálculo de la resolución, podemos concluir que con el canal corto las resoluciones entre los picos son mayores y por tanto mejor es la calidad de la separación de nuestros analitos, sobre todo con aquellos con bajo nivel de retención.

Representando los datos obtenidos para cada uno de los canales, de los tiempos de retención medios (a los cuales se les ha restado el valor t_0 correspondiente al tiempo del “void peak”) para cada uno de los estándares de poliestireno frente a sus correspondientes diámetros hidrodinámicos, obtenemos las siguientes gráficas, las cuales nos permiten deducir la relación lineal que existe entre los tiempos de elución de nuestros analitos y sus respectivos tamaños.



Figuras 9 y 10. Representación lineal del diámetro hidrodinámico de las especies frente a sus tiempos de retención para el canal corto (izquierda) y para el canal largo (derecha).

4.1.2 Estudio del efecto de la variación del crossflow en la separación.

A partir del estudio anterior realizado con los dos canales y atendiendo a los resultados experimentales obtenidos en los mismos, se va a trabajar con el canal corto, puesto que ofrece mejores prestaciones en cuanto a resolución.

En este estudio trabajaremos a distintos crossflows con el objeto de estudiar la influencia de este parámetro en la separación de las NPs. Partiendo de las ecuaciones (6) y (7), podemos observar que el valor del crossflow va a influir tanto en las anchuras de los picos como en sus tiempos de retención. Teóricamente, por un lado, a mayor crossflow, mayores serán los tiempos de retención de las NPs. Por otro lado, a mayor crossflow mayores serán las distancias entre los picos y por tanto mayores las resoluciones entre ellos.

Para realizar este estudio trabajamos con dos estándares de NPs de poliestireno, de 100 y 200 nm.

Los resultados experimentales obtenidos se expresan como media \pm desv. estándar (n=3). Para el estándar de 100 nm de poliestireno los resultados fueron los siguientes:

Cross flow (mL/min)	tr (min)	Área pico	Área FIA	Recuperación %
0,1	7,82 \pm 0,07	110862 \pm 5446	130634 \pm 204	84,9 \pm 4,2
0,2	9,39 \pm 0	108190 \pm 577	130634 \pm 204	82,8 \pm 0,4
0,4	14,15 \pm 0,02	107457 \pm 573	130634 \pm 204	82,3 \pm 0,4

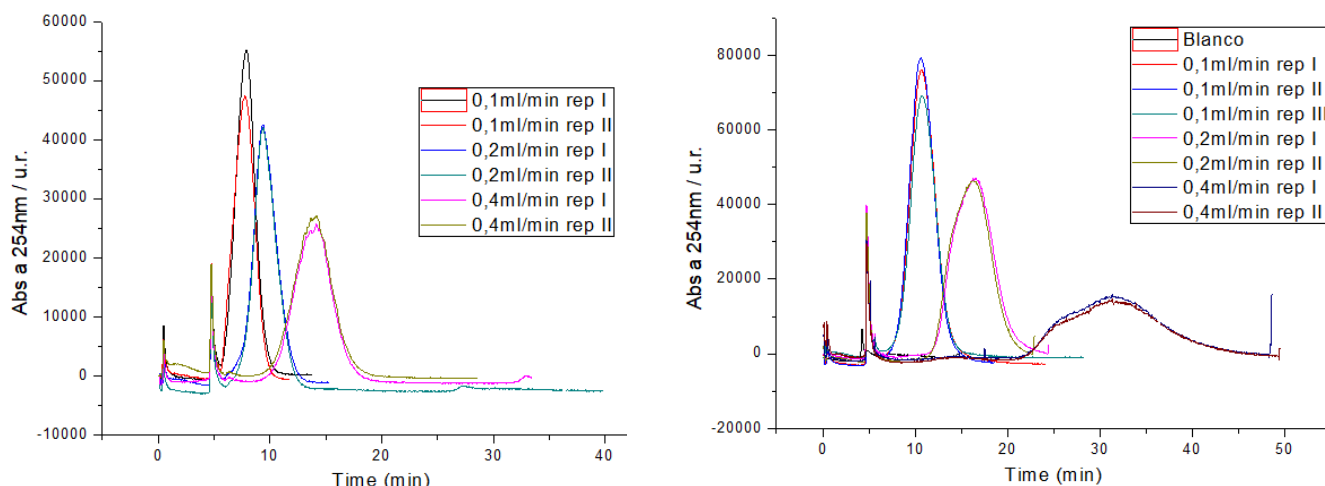
Tabla 6. Resultados experimentales obtenidos a diferentes valores de crossflow con el estándar de 100nm.

Notar, en los valores de la tabla, que en este último estudio se realizó un mismo análisis sin separación para cada uno de los diferentes crossflows.

Por otro lado, en las mismas condiciones que las anteriores, los resultados obtenidos para el estándar de 200nm de poliestireno fueron los siguientes:

Cross flow (ml/min)	tr (min)	Área pico	Área FIA	Recuperación %
0,1	10,69 \pm 0,07	265225 \pm 1078	300821 \pm 1749	88,2 \pm 0,3
0,2	16,26 \pm 0,01	257250 \pm 3436	300821 \pm 1749	85,5 \pm 1,1
0,4	31,34 \pm 0,02	203105 \pm 5105	267697 \pm 8681	75,9 \pm 1,9

Tabla 7. Resultados experimentales obtenidos a diferentes valores de crossflow con el estándar de 200nm.



Figuras 11 y 12. Fractogramas correspondientes a la separación de NPs de poliestireno de 100 y 200 nm a diferentes valores de crossflows.

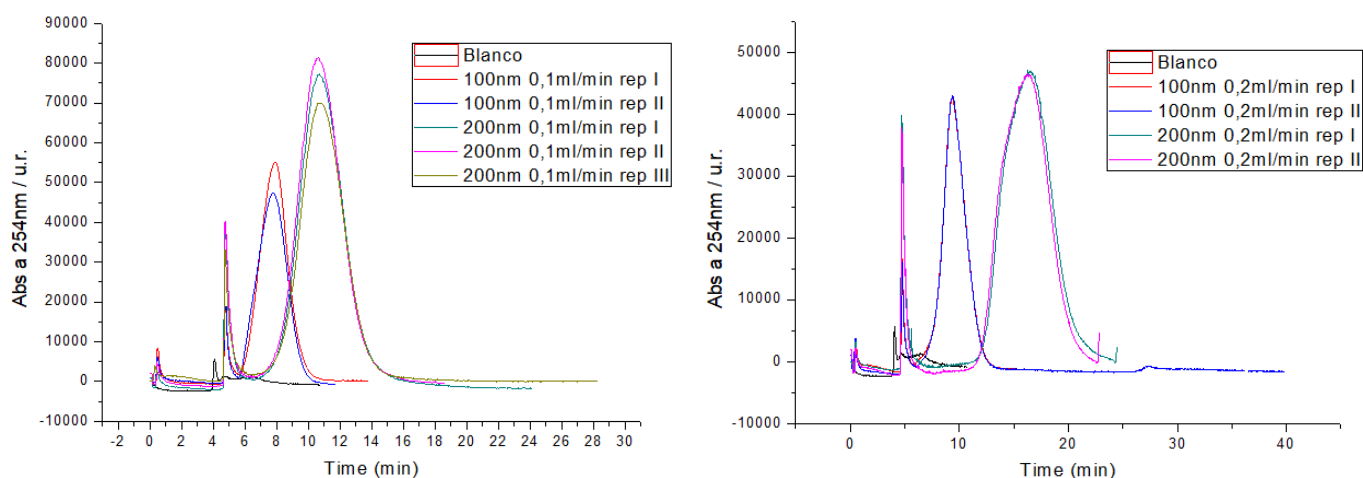
Por tanto, a la vista de los resultados experimentales obtenidos, podemos afirmar que:

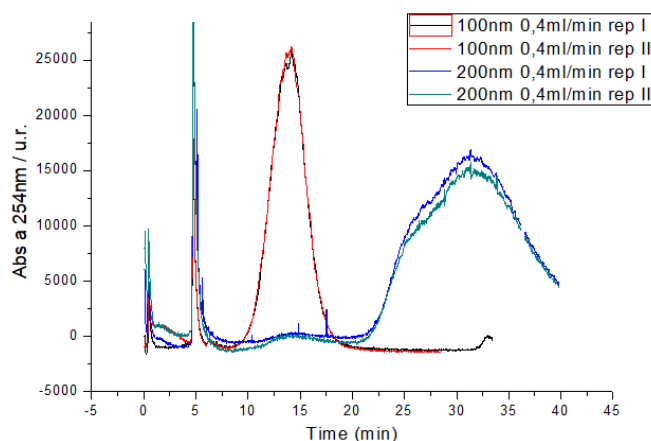
- Al aumentar el crossflow aumentan los tiempos de elución de los analitos en el canal, por tanto la separación de los mismos requiere más tiempo de realización, en consonancia con la expresión teórica que relaciona el t_r con el crossflow (ecuación (6)).
- Al aumentar el crossflow disminuyen las recuperaciones, por tanto podríamos decir que este es otro de los factores negativos que supone un aumento del crossflow.

Si se realiza una comparativa de las resoluciones obtenidas, con los estudios llevados a cabo sobre la variación del cross flow en ambos estándares de poliestireno (100 y 200nm), se obtienen los siguientes resultados:

Cross flow (mL/min)	Anchura (min) 100nm	Anchura (min) 200nm	Resolución (100-200 nm)
0,1	$2,07 \pm 0,10$	$3,06 \pm 0,03$	1,12
0,2	$2,22 \pm 0,02$	$5,21 \pm 0,003$	1,85
0,4	$3,75 \pm 0,03$	$12,24 \pm 0,05$	2,15

Tabla 8. Resoluciones obtenidas entre los estándares de 100 y 200 nm a distintos valores de crossflow.





Figuras 11,12 y 13. Fractogramas correspondiente a la separación de NPs de poliestireno de 100 y 200 nm a crossflows de 0,1, 0,2 y 0,4 mL/min respectivamente.

Tras este estudio, a la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que un incremento en el caudal del crossflow se traduce en un aumento de las resoluciones entre los picos al aumentar los tiempos de retención y por tanto se mejora la separación de las nanopartículas de poliestireno. Eso sí, a costa de aumentar los tiempos de retención de los analitos, ensanchar los picos y provocar una disminución de las recuperaciones como hemos comentado anteriormente.

4.1.3 Estudio del efecto de la variación del caudal a la salida en la separación.

Mientras que el nivel de retención es proporcional al cociente V_c/V_{out} , un aumento en el caudal a la salida conlleva un menor tiempo de retención, al aumentar la velocidad a lo largo del canal. (Ecuación (6)). Sin embargo la influencia de esta variable en las anchuras de los picos es prácticamente insignificante, pues estamos hablando de la raíz cuadrada del ln de un cociente (Ecuación (7)). Por tanto, el caudal a la salida tendrá poca incidencia en la resolución de los picos. Para llevar a cabo este estudio utilizamos el estándar de poliestireno de 200nm, haciendo uso del canal de longitud corta y de una suspensión de concentración 30 mg/L. Se llevó a cabo la medición de 2-3 réplicas a distintos caudales a la salida: 0,5, 0,8, 1,0 y 1,3 mL/min.

Se realizó un mismo análisis FIA (sin separación) para los distintos caudales a la salida, como resultado se obtuvo que:

$$\text{Área media picos FIA} = 308129 \pm 9777$$

En este caso para el cálculo de las recuperaciones utilizamos una expresión diferente que la utilizada en los estudios previos, en la cual incluimos el caudal a la salida aplicado (al ser la señal proporcional a la concentración y a la masa inyectada).

$$\text{Recuperación \%} = (\text{Área pico} / \text{Área FIA}) * (\text{Caudal a la salida}) * 100$$

En este estudio introducimos un nuevo parámetro, el volumen de elución. Calculamos su valor de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Vol. Elución} = (t_r - t_0) * \text{Caudal a la salida}$$

Los resultados experimentales fueron los siguientes:

Caudal a la salida (mL/min)	t ₀ (min)	tr (min)	Vol. Elución (mL)
0,5	4,98 ± 0,01	16,97 ± 0,23	5,98 ± 0,12
0,8	4,85 ± 0,01	12,13 ± 0,04	5,82 ± 0,03
1	4,74 ± 0,01	10,69 ± 0,07	5,95 ± 0,08
1,3	4,63 ± 0,01	9,55 ± 0,07	6,39 ± 0,10

Caudal a la salida (mL/min)	Área pico	Recuperaciones %	Anchura (min)
0,5	500819 ± 100665	81,3 ± 16,3	5,79 ± 0,03
0,8	315856 ± 41505	82,0 ± 10,8	3,90 ± 0,01
1	255569 ± 13684	82,9 ± 4,4	3,06 ± 0,03
1,3	206082 ± 1607	86,9 ± 0,7	1,79 ± 0,07

Tabla 9. Resultados experimentales obtenidos con el estándar de 200 nm a diferentes caudales a la salida.

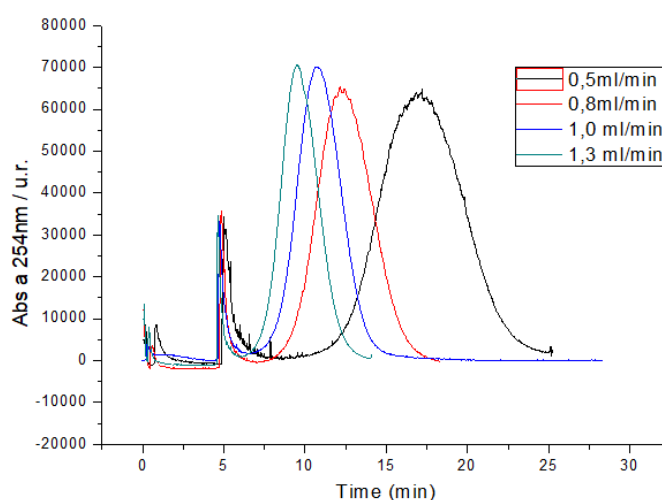


Figura 14. Fractograma correspondiente al estudio basado en la separación de NPs de poliestireno de 200 nm a distintos caudales a la salida.

Para poder observar claramente el efecto que supone una modificación del caudal a la salida y simplificar el gráfico, representamos únicamente una de las réplicas realizadas para cada caudal a la salida.

En base a los resultados experimentales obtenidos podemos decir que:

- Una disminución del caudal de salida provoca un aumento de los tiempos de elución de nuestros analitos en el canal, de manera proporcional precisamente a su valor, tal y como se demuestra al representar los volúmenes de elución.
- Las recuperaciones no se ven afectadas ante una variación del caudal de salida, como podemos observar se mantienen aproximadamente constantes (81-87%).
- Las anchuras de los picos en el fractograma aumentan al incrementar el caudal de salida, aunque se mantienen aproximadamente constantes si considera el volumen en lugar del tiempo (en torno a 3 mL, excepto en el caso del caudal de 1,3 mL/min donde el efecto es mayor (pico más estrecho)).

Por lo tanto, un aumento del caudal de salida lleva a tiempos de retención menores y picos más estrechos, manteniendo en general los valores de recuperación. Sin embargo, este aumento es a costa de aumentar la presión en el interior del canal, que viene limitado por el propio instrumento a

15 bar para evitar problemas de fugas o roturas de la parte superior del canal (pieza de metacrilato). Puesto que la presión de 1,3 mL/min estaba próxima a ese valor límite, se optó por trabajar en unas condiciones de menor caudal, fijándolo en 1,0 mL/min.

4.1.4 Estudio de la influencia de la fase móvil utilizada en la separación.

La fase móvil o portador es uno de los parámetros más importantes y más flexibles en AF4. Idealmente el portador debe imitar las propiedades físico-químicas de nuestra suspensión de NPs (pH, fuerza iónica, composición química).

En este caso vamos a abordar el estudio del efecto que puede tener el cambio de la composición del portador utilizado, en cuanto a la presencia o ausencia de un tensoactivo mixto y consecuentemente el cambio de pH y fuerza iónica, en la separación de las NPs. Para ello trabajaremos con dos portadores distintos, Novachem 0,05% y agua ultrapura de calidad Milli-Q.

Portador	PH
Novachem 0,05%	8,5 - 9,5
Agua Mili-Q	6,5 - 7

Tabla 10. Diferencias de pH de los portadores utilizados.

Vamos a comparar la separación de los estándares de poliestireno obtenida con Novachem 0,05% con la separación obtenida con agua ultra pura como portador.

Al igual que en los anteriores estudios se realizaron 2-3 réplicas para cada uno de los estándares de poliestireno. Los resultados experimentales obtenidos con agua ultrapura como portador fueron los siguientes:

NPs tamaño	tr (min)	Área pico	Área FIA	Recuperación %
100nm	6,89 ± 0,04	119013 ± 1986	137581 ± 1436	86,50 ± 1,44
200nm	8,64 ± 0,17	237595 ± 5546	268397 ± 1543	88,52 ± 2,06
500nm	14,19 ± 0,10	200001 ± 3369	230782 ± 181	86,66 ± 1,46

Tabla 11. Resultados obtenidos en la separación de NPs de poliestireno con agua Mili-Q como portador (1).

Podemos comparar esta tabla con la tabla 4., en la cual se ha utilizado Novachem 0,05% como portador. Por otro lado las resoluciones calculadas a partir de los datos experimentales obtenidos:

NPs tamaño	Anchura (min)	Comparación	Resolución
100nm	1,41 ± 0,06	100 - 200 nm	0,78
200nm	3,03 ± 0,27	200 - 500 nm	1,68
500nm	3,56 ± 0,08	100 - 500 nm	2,94

Tabla 12. Resultados obtenidos en la separación de NPs de poliestireno con agua Mili-Q como portador (2).

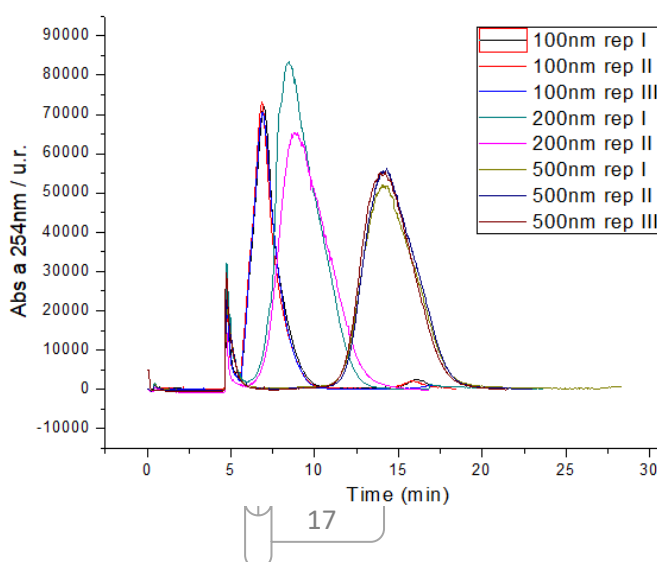


Figura 15. Fractograma correspondiente a la separación de NPs de poliestireno de 100, 200 y 500 nm utilizando agua ultrapura como portador (ausencia de tensoactivo).

Así pues, observamos que en ausencia de tensoactivo, disminuyen los tiempos de elución de las NPs y las anchuras de los picos, no habiendo diferencias significativas en las recuperaciones. La relación entre los t_r y los diámetros hidrodinámicos sigue la relación lineal que se representa a continuación.

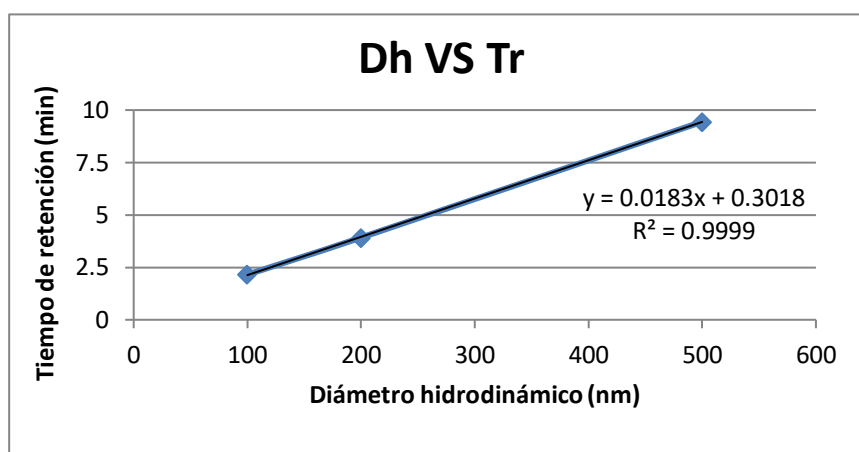


Figura 16. Representación lineal del diámetro hidrodinámico de las especies frente a sus tiempos de retención utilizando agua ultrapura como portador.

4.2 SEPARACIÓN DE ESTÁNDARES POLIDISPERSOS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE TITANIO DE DIFERENTES TAMAÑOS.

Una vez modelizado el comportamiento del canal y estudiado sus prestaciones, se trabajó con suspensiones de nanopartículas de óxido de titanio de distinto tamaño de cara a evaluar la posibilidad de utilizar el canal corto para la separación de estas NPs en distintos tipos de muestras que las contienen. Estas suspensiones tienen la dificultad de mantener su estabilidad, debido a su tendencia a formar agregados, así como una mayor interacción con los componentes del canal, tal y como se ha observado en estudios previos con el canal largo realizados por otros miembros del equipo de investigación, lo que hace reducir su recuperación. La única variable que se revisó fue el crossflow, precisamente para evaluar el impacto sobre la recuperación, ya que como hemos visto en estudios anteriores realizados con NPs de poliestireno, un incremento del crossflow supone un aumento de las resoluciones, por tanto la calidad de separación de las NPs mejorará.

4.2.1 Separación con Crossflow de 0,1 mL/min.

Trabajamos con dos estándares comerciales de TiO_2 de diferente tamaño, de 30nm y 50nm.

En el equipo, para realizar cada una de las medidas, inyectaremos 100 μL de una suspensión de NPs de TiO_2 de concentración 15 mg/L.

Las condiciones experimentales utilizadas para llevar a cabo este estudio fueron las siguientes:

Canal	Longitud corta
Fase móvil	Novachem 0,05%
Caudal a la salida	1 mL/min
Crossflow	0,1 mL/min

Tabla 13. Condiciones experimentales utilizadas (1).

Se realizaron 2-3 réplicas de cada uno de los estándares comerciales, en este caso los resultados se registraron a la longitud de onda de 350 nm (máx. de absorción del TiO_2), los resultados experimentales fueron los siguientes:

NPs tamaño	tr (min)	Área pico	Área FIA	Recuperación
30 nm	10,08 ± 0,32	31565 ± 7129	70254 ± 337	44,9 ± 10,1
50 nm	9,51 ± 0,22	34624 ± 5255	73644 ± 692	47,0 ± 7,1

Tabla 14. Resultados obtenidos en la separación de estándares de TiO_2 de 30 y 50 nm a crossflow de 0,1mL/min

La resolución obtenida para los picos de cada uno de los estándares:

NPs tamaño	Anchura (min)	Estándares	Resolución
30 nm	5,23 + 0,19	30nm – 50 nm	0,11
50 nm	5,11 + 0,17		

Tabla 15. Resolución entre los estándares de TiO_2 de 30 y 50 nm a crossflow de 0,1mL/min.

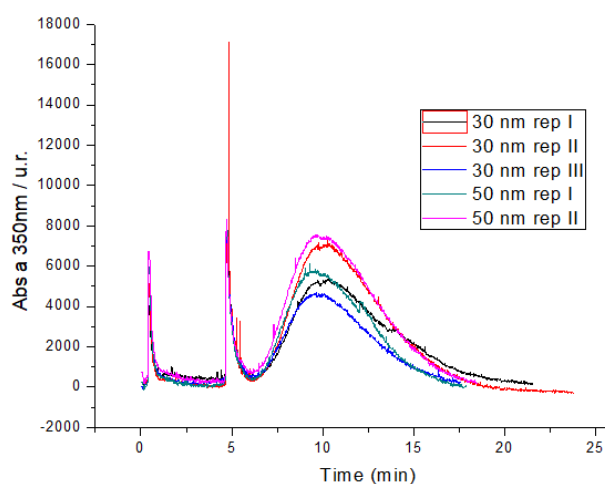


Figura 17. Fractograma correspondiente a la separación de NPs de TiO_2 de 30 y 50 nm aplicando un crossflow de 0,1mL/min.

4.2.2 Separación con Crossflow de 0,2mL/min.

Por tanto será difícil llevar a cabo una separación efectiva de los diferentes estándares, una solución que permita mejorar dicha separación sería aumentar el crossflow.

Las condiciones experimentales utilizadas para llevar a cabo este estudio fueron las siguientes:

Canal	Longitud corta
Fase móvil	Novachem 0,05%
Caudal a la salida	1 mL/min
Cross flow	0,2 mL/min

Tabla 16. Condiciones experimentales utilizadas (2).

Al igual que en el anterior estudio, se realizaron 2-3 réplicas de cada uno de los estándares comerciales. Los resultados registrados a la longitud de onda de 350 nm fueron los siguientes:

NPs tamaño	tr (min)	Área pico	Área FIA	Recuperación %
30 nm	12,65 ± 0,19	15002 ± 1112	63414 ± 95	23,6 ± 1,7
50 nm	15,33 ± 1,13	7051 ± 488	50753 ± 1737	13,9 ± 1,0

Tabla 17. Resultados obtenidos en la separación de estándares de TiO₂ de 30 y 50 nm a crossflow de 0,1mL/min

La resolución obtenida para los picos de cada uno de los estándares:

NPs tamaño	Anchura (min)	Estándares	Resolución
30 nm	5,96 ± 0,12	30nm - 50nm	0,43
50 nm	6,47 ± 1,12		

Tabla 18. Resolución entre los estándares de TiO₂ de 30 y 50 nm a crossflow de 0,1mL/min.

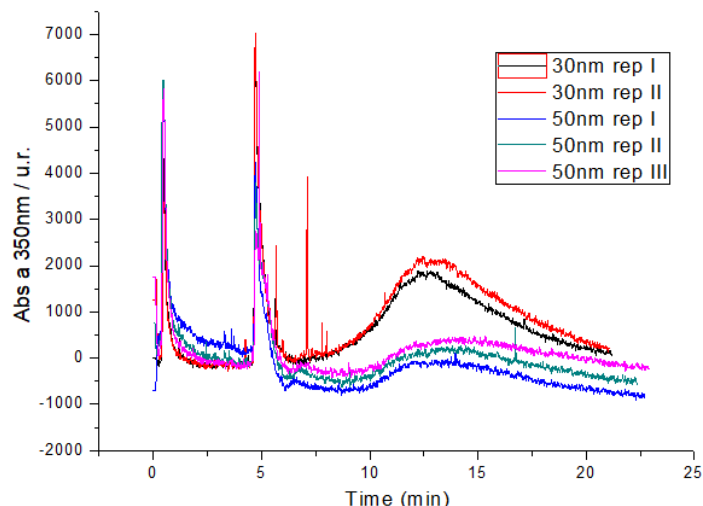


Figura 18. Fractograma correspondiente a la separación de NPs de TiO₂ de 30 y 50 nm aplicando un crossflow de 0,2 mL/min.

Hemos podido observar, tras los resultados obtenidos, que los estándares de NPs de TiO₂ son polidispersos, lo que se refleja en las elevadas anchuras de los picos obtenidos, mucho mayores a lo esperado de acuerdo a los tiempos de retención. En relación a la modificación del crossflow, su incremento mejora la resolución, tal y como se obtuvo anteriormente, pero esta mejora supone al mismo tiempo una disminución considerable en las recuperaciones y un aumento de los tiempos de retención de los analitos en el interior del canal.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE TITANIO EN PRODUCTOS DE CONSTRUCCIÓN CON PROPIEDADES FOTOCATALÍTICAS.

El objetivo de este estudio es detectar la presencia de NPs de dióxido de titanio en productos de construcción con propiedades fotocatalíticas, llevar a cabo su separación y conocer su tamaño en base a los resultados obtenidos en los estudios previos realizados. Se hará también una adición de una de las NPs de TiO₂ comerciales para estudiar la recuperación de la misma en la muestra y evaluar la capacidad de separación del procedimiento desarrollado aplicado a una muestra aplicando diferentes crossflows.

4.3.1 Caracterización del tamaño de las nanopartículas en el producto.

En primer lugar, como he mencionado previamente, para llevar a cabo este estudio, utilizamos una suspensión de concentración 18,5 mg/L aproximadamente únicamente de pintura fotoactiva.

Los resultados registrados a la longitud de onda de 350 nm, correspondiente a las NPs de anatasa propias de la pintura, fueron los siguientes, se expresan como media \pm desv. estándar (n=3):

Longitud onda	tr (min)	Área pico	Área FIA	Recuperación %
350 nm	6,51 \pm 0,02	9056 \pm 369	10990 \pm 267	82,4 \pm 3,6

Tabla 19. Resultados experimentales obtenidos con la suspensión de pintura fotoactiva.

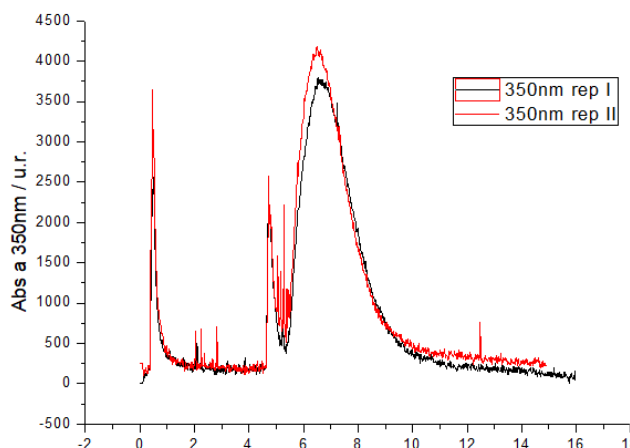


Figura 19. Fractograma debido a la presencia de NPs de TiO₂ en muestras de productos de construcción con propiedades fotocatalíticas.

4.3.2 Estudio de las capacidades de resolución del procedimiento desarrollado en la separación tras la adición de nanopartículas de TiO₂.

En segundo lugar vamos a realizar una serie de inyecciones de la suspensión de concentración 15 mg/L en pintura fotoactiva y 15 mg/L de la suspensión de las NPs de TiO₂ de 30 nm de diámetro. Los resultados experimentales que se obtuvieron fueron los siguientes:

Compuesto	longitud onda	tr (min)	Área pico	Área FIA	Recuperación %
Material construcción	350nm	6,41 \pm 0,11	10169 \pm 1328	70544 \pm 529	75,2 \pm 4,2
NPs TiO ₂ de 30 nm	350nm	10,25 \pm 0,29	42893 \pm 3923	70544 \pm 529	

Tabla 20. Resultados obtenidos con la suspensión de pintura y TiO₂ de 30nm a crossflow de 0,1 mL/min.

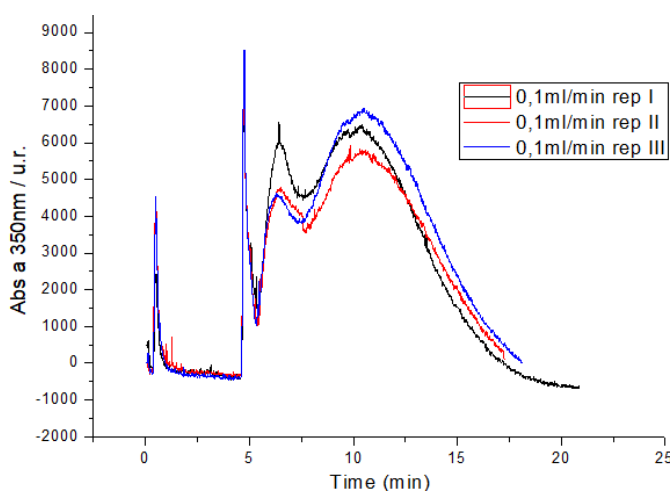


Figura 20. Fractograma correspondiente a la separación de NPs de TiO₂ presentes en el material de construcción tras la adición del std de TiO₂ de 30nm, aplicando un crossflow de 0,1mL/min.

En la siguiente figura se representa la señal obtenida. En las condiciones de medida, a pesar de que se distinguen los dos picos, no es posible llevar a cabo el cálculo de la recuperación individual de cada uno de ellos, por lo que se calculó el valor de recuperación total, siendo este cercano al 80%, valor próximo al obtenido con el material inyectado solo, y mejor que el obtenido cuando se inyectaba la suspensión de las NPs de TiO₂ de 30 nm (valor de $45 \pm 10 \%$), por lo que la presencia de la matriz de la muestra parece que disminuye las interacciones de las NPs de TiO₂ en el canal, mejorando así los valores de recuperación.

Además, a partir de estos resultados, podemos realizar una estimación del tamaño a partir de la relación lineal entre el tiempo de retención y el diámetro obtenida con los poliestirenos, recta del apdo. 4.1 (figura 9). Por un lado observamos que el tr del NPs de 30 nm de TiO₂ sale del orden de 200 nm, lo que indica que hay agregados de nuestras NPs. Por otro lado que el tr del material de construcción está en el límite inferior de la recta y que da un valor muy bajo (casi 1 nm), algo erróneo al ser una extrapolación de la recta (el valor más pequeño es el de 100 nm de poliestireno).

Por otro lado, atendiendo a las anchuras obtenidas para cada uno de los picos y aplicando la ecuación general para el cálculo de resolución entre picos, se obtiene el siguiente resultado:

Compuesto	longitud onda	tr (min)	Anchura (min)	Resolución
Material de construcción	350nm	$6,41 \pm 0,11$	$2,03 \pm 0,13$	1,07
NPs TiO ₂ de 30 nm	350nm	$10,25 \pm 0,29$	$5,12 \pm 0,10$	

Tabla 21. Resoluciones obtenidas con la suspensión de pintura y TiO₂ de 30nm a crossflow de 0,1 mL/min.

Dado que las recuperaciones en este medio mejoraron respecto a las obtenidas en el propio portador, se estudió la posibilidad de mejorar la separación aumentando el crossflow, tratando de explorar las posibilidades de separación del procedimiento desarrollado en la separación de NPs de TiO₂ en este tipo de muestras. En este estudio realizaremos una serie de inyecciones de la suspensión que contiene pintura y TiO₂, pero a diferencia del caso anterior aumentaremos el crossflow a 0,2 mL/min. Los resultados experimentales obtenidos fueron los siguientes:

Compuesto	longitud onda	tr (min)	Área pico	Área FIA	Recuperación %
Material Construcción	350nm	$6,76 \pm 0,23$	8252 ± 308	70544 ± 529	$60,1 \pm 0,8$
NPs TiO ₂ de 30nm	350nm	$14,57 \pm 0,31$	34119 ± 404	70544 ± 529	

Tabla 22. Resultados obtenidos con la suspensión de pintura y TiO₂ de 30nm a crossflow de 0,2 mL/min.

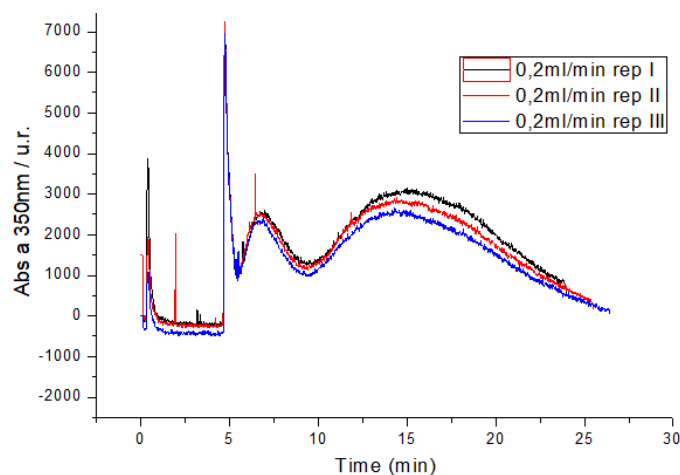


Figura 21. Fractograma correspondiente a la separación de NPs de TiO₂ presentes en el material de construcción tras la adición del std de TiO₂ de 30nm, aplicando un crossflow de 0,2mL/min.

Atendiendo a las anchuras obtenidas para cada uno de los picos y aplicando la ecuación para el cálculo de resolución entre picos obtengo el siguiente resultado:

Compuesto	longitud onda	tr (min)	Anchura (min)	Resolución
Material Construcción	350nm	$6,76 \pm 0,23$	$2,24 \pm 0,04$	1,15
NPs TiO ₂ de 30nm	350nm	$14,57 \pm 0,31$	$11,38 \pm 0,14$	

Tabla 24. Resoluciones obtenidas con la suspensión de pintura y TiO₂ de 30nm a crossflow de 0,2 mL/min.

Por tanto podemos observar, a la vista de los resultados obtenidos, que el aumento de cross flow permite separar mejor los dos tipos de nanopartículas incrementando ligeramente la resolución. Eso sí, el aumento de cross flow llevará disminuciones en términos de recuperación e incrementará los tiempos de elución de las NPs, como habíamos visto en estudios previos.

4.3.3 Caracterización mediante AF4-ICP-MS.

El ICP-MS es un detector multielemental que utiliza un plasma de acoplamiento inductivo para ionizar la muestra y posteriormente los iones son separados en función de su relación masa-carga y conducidos al detector para ser cuantificados de forma individual. El objetivo principal de realizar el estudio con el ICP-MS acoplado es llevar a cabo una cuantificación, de manera más fiable, de las NPs de dióxido de titanio presentes tanto de la pintura fotoactiva como en el estándar comercial de 30nm, que la que nos aporta el detector UV-VIS. Para ello, trabajamos durante con el equipo acoplado de manera on-line tanto al detector UV-VIS como a un detector ICP-MS. La gran ventaja de la combinación AF4-ICP-MS no es solo la posibilidad de detección multielemental, sino también la capacidad de llevar a cabo determinaciones muy sensibles en comparación al detector UV-VIS, alcanzando límites de detección del orden de ng/L ¹⁰. Sin embargo tiene algunas limitaciones, como la dificultad de trabajo con dicho equipo o los altos costes que supone su uso.

Para llevar a cabo las medidas, se trabajó con los dos canales y se prepararon dos suspensiones de concentración 500µg/L, una de pintura fotoactiva y otra a partir del estándar comercial de TiO₂ de 30 nm. Los fractogramas correspondientes a las medidas realizadas se adjuntan en los anexos (Ilustraciones 1, 2, 3 y 4).

Los resultados experimentales obtenidos durante los días que se trabajó con el equipo acoplado al ICP-MS no fueron buenos, lo que puede deberse principalmente a procesos de envejecimiento de la

membrana del canal, que hicieron que las recuperaciones obtenidas fueran muy bajas. Además, este efecto se acentúa aún más al disminuir la concentración de las suspensiones inyectadas al orden de 500 µg/L. (Tener en cuenta que antes se inyectaban volúmenes de suspensiones de concentración 15 mg/L).

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente Trabajo de Fin de Grado pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. El uso de canales de menores dimensiones en AF4 respecto a los convencionales (canal largo) permite mejorar la resolución de las especies separadas, al disminuir las anchuras de los picos eluidos y mantener los tiempos de retención, con unas recuperaciones del mismo orden. Esto se ha comprobado con nanopartículas de poliestireno utilizadas como modelo. Así mismo, se han estudiado diferentes variables que afectan a la separación en AF4, ajustándose éstas al comportamiento teórico esperado.
2. La separación de nanopartículas de óxido de titanio mediante AF4 se ve dificultada en primer lugar por la polidispersidad de las propias nanopartículas, aumentando así la anchura de los picos, su agregación en los medios de suspensión y separación, con tamaños estimados mucho mayores a los dados por el fabricante, y bajos valores de recuperación.
3. En el caso de las nanopartículas presentes en una muestra compleja, como el producto de construcción, la recuperación mejora debido al posible efecto de estabilización de la propia matriz. La caracterización por tamaño mediante calibración con las nanopartículas de poliestireno no ha sido posible debido a las diferencias de tamaño entre los estándares y las nanopartículas de la muestra, mucho más pequeñas.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Baalousha, M. Stolpe, B. Lead, J.R. Flow field – flow fractionation for the analysis and the characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: A critical review. *Journal of Chromatography A*. **2011**, 1218, 4078-4103.
2. Bendixen, N., Losert, S., Adlhart, C., Lattuada, M., Ulrich, A. Membrane – particle interactions in an asymmetric flow field flow fractionation channel studied with titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Chromatography A*. **2014**, 1334, 92-100.
3. Eunsun Ji, Seong-Ho Choi, Kuk Ro Yoon, Jong-Han Chun, and Seungho Lee. Elution Behaviour of Protein and Pullulan in Asymmetrical Flow Field-flow Fractionation (AsF4FFF). *Bull. Korean Chm. Soc.* **2006**, Vol 27, No.9.
4. Laborda, F., Bolea, E., Cepriá, G., Gómez, María T. Jiménez, María S., Perez-Arantegui, J., Castillo, J.R. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Analytica Chimica Acta*. **2016**, 10-32.
5. De la Calle, I., Menta, M., Klein, M., Maxit, B., Séby, F. Towards routine analysis of TiO₂ (nano-)particle size consumer products: Evaluation of potential techniques. *Spectrochimica Acta Part B*. **2018**, 147, 28-42.
6. Omar, J., Boix, A., Kerckhove, G., Von Holst, C. Optimisation of asymmetric flow field-flow fractionation for the characterisation of nanoparticles in coated polydisperse TiO₂ with applications in food and feed. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2016**, 33:12, 1775-1784.
7. Von der Kammer F., Legros S., Larsen E.H., Loeschner K., Hofmann T. Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by fieldflow fractionation. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. **2011**, 30:425-436.
8. Gigault, J. Pettibone, John M. Schmitt, C. Hackley, V. Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation. *Analytica Chimica Acta*. **2014**, 809, 9-24.
9. Rashid N. Qureshi and Wim Th. Kok. *Optimization of Asymmetrical Flow Field-flow Fractionation (AF4)*. Polymer-Analysis Group, van't Hoff Institute for Molecular Sciences, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands. LCGC Europe. **2010**, Vol. 23, Issue 1, pg 18–25.
10. Nischwitz, V., Goenaga-Infante, H. Improved simple preparation and quality control for the characterisation of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using flow field flow fractionation on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **2012**, Vol. 27, No 7, pg 1041-1158.

7. ANEXOS

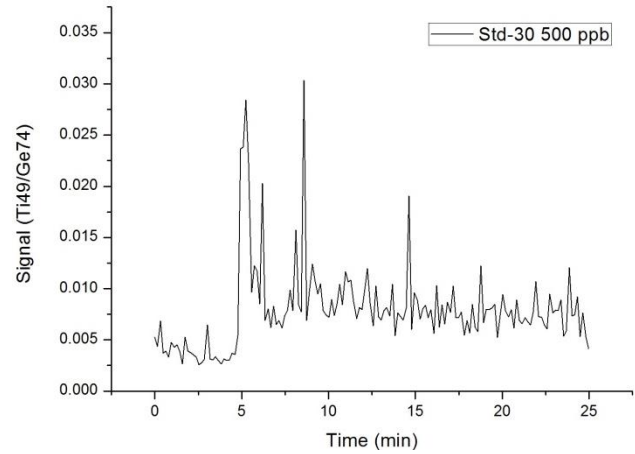
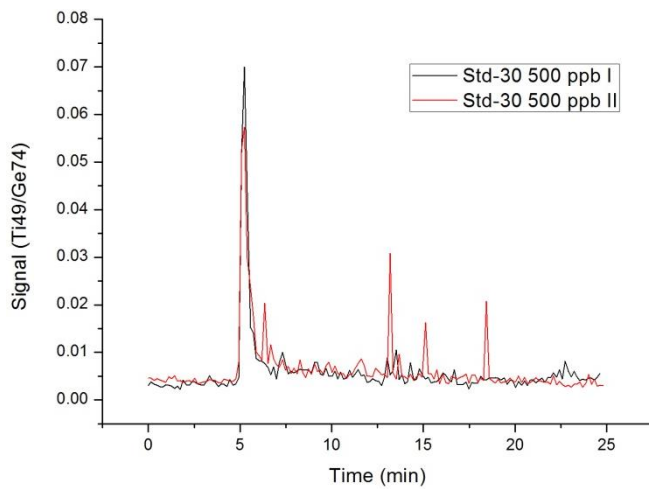


Ilustración 1 y 2. Fractogramas correspondientes a la inyección de 100 μL de las suspensiones de concentración 500 $\mu\text{g/L}$ de NPs de TiO_2 de 30nm, utilizando el canal largo (Izquierda) y el canal corto (Derecha).

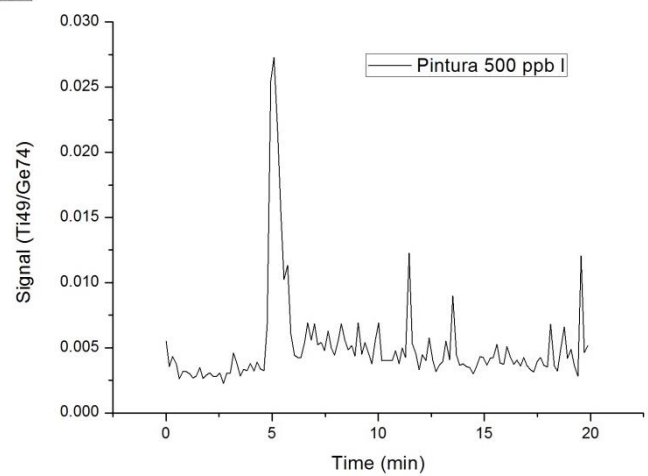
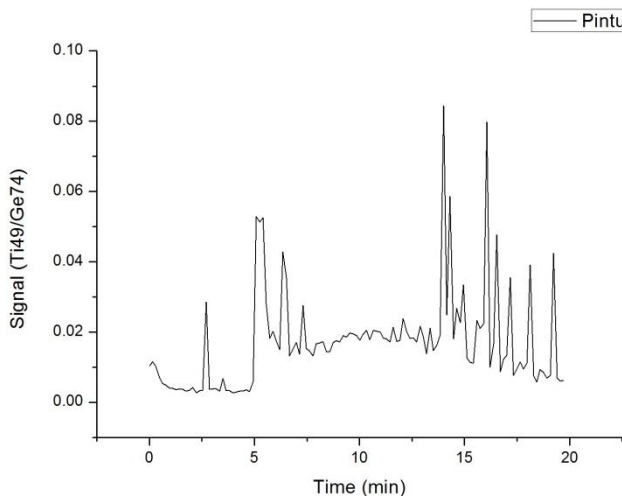


Ilustración 3 y 4. Fractogramas correspondientes a la inyección de 100 μL de las suspensiones de concentración 500 $\mu\text{g/L}$ de la pintura fotoactiva, utilizando el canal largo (Izquierda) y el canal corto (Derecha).